

· 制剂与质量 ·

壳聚糖游离膜在不同溶出介质中的降解性能研究

曾 敏¹, 谢兴亮¹, 杨 明^{1,2*}, 王 森¹, 高亚男¹, 蒋巧梅¹

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要:目的 通过对比壳聚糖游离膜在不同酶液中的降解性能, 筛选适宜于壳聚糖包衣结肠定位制剂体外的溶出介质。方法 将壳聚糖制备成游离膜, 以膜消化率、易碎性为评价指标, 对其在复合果胶酶、进口果胶酶、胰酶、-葡萄糖苷酶、大鼠结肠内容物等中的降解进行考察, 并采用电镜扫描技术对变异性较大的膜表面性状进行观察, 最终确定对壳聚糖降解最敏感酶液。结果 大鼠结肠内容物、复合果胶酶、进口果胶酶对壳聚糖游离膜均有不同程度的降解, 其中大鼠结肠内容物降解性能最强, 游离膜在该介质中 24 h 后成碎片, 且膜表面最为粗糙; 而游离膜对-葡萄糖苷酶和胰酶不敏感。结论 通过游离膜降解试验, 明确了壳聚糖的敏感酶类, 为结肠定位制剂体外溶出介质的选择提供了科学的依据。

关键词: 壳聚糖; 游离膜; 酶解; 结肠定位

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)07-1050-03

Degradation property of chitosan free-film in different dissolution media

ZEN G Min, XIE Xing-liang¹, YANG Ming^{1,2}, WANG Sen¹, GAO Ya-nan¹, JIANG Qiao-mei¹

(1. Pharmaceutical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract : Objective Through comparing the degradation property of chitosan free-film in different dissolution media to screen dissolution media *in vitro* suitable for colon-specific delivery formulation by chitosan-coating. **Methods** Preparing the chitosan into free-film and taking the digestibility and fragmentation as indices, the degradation of free-film in domestic compound pectinase, imported pectinase, pancreatin, -glucosidase, and rat colon contents were investigated. Also by electron microscopic observation to study film surface character on the great degrees of variation and finally determine the most sensitive enzyme solution. **Results** Domestic compound pectinase, imported pectinase, and rat colon contents could degrade chitosan free-film in different degrees, where the rat colon contents was the most in which the free-film could be degraded into small pieces after 24 h and the surface was the most roughening, while the free film was not sensitive in pancreatin and -glucosidase. **Conclusion** By the degradation experiment of free-film, the sensitive enzyme on chitosan could be made clear by strong pertinency so as to provide the scientific basis for the selection of dissolution media *in vitro* on colon-specific delivery formulation.

Key words : chitosan ; free-film ; enzymatic hydrolysis ; colon-specific

近年来,结肠靶向给药系统的研究已成为药剂研究的热点领域,形成了时滞型、pH 依赖型、酶触发型以及压力依赖型等多种原理的释药系统,其中时滞型、pH 依赖型研究较多,但由于消化道的 pH 值及转运时间受食物、性别、疾病等个体因素影响较大,这两种释药系统释药性能并不稳定,结肠定位性

不理想。因此,基于结肠与上消化道菌群的巨大差异而设计的菌群触发型口服结肠定位递送系统(bacterially triggered colon specific drug delivery system, BCDDS)成为该领域的发展方向^[1]。壳聚糖是一种天然氨基多糖,其分子中的糖苷键能被结肠酶降解,是一种有发展前景的结肠制剂辅料。本

* 收稿日期: 2008-11-26

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BA09B08-14); 四川省中医药管理局专项资助项目(200615)

作者简介: 曾 敏(1982—), 女, 四川资阳人, 中药制剂专业硕士研究生, 2006年毕业于湖北中医学院, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。Tel: 13880795021 E-mail: minzeng-zeng@163.com

* 通讯作者 杨 明 E-mail: yangming16@126.com

实验通过对壳聚糖游离膜在不同溶出介质的降解性能进行考察,明确该材料的结肠定位性能,并最终确定对壳聚糖降解最敏感酶液,为结肠定位制剂体外溶出介质的选择提供科学的依据。

1 试验材料

壳聚糖(Sigma,脱乙酰度大于 85%),进口果胶酶(T2445, > 40 U/mg, Sanland-chem International Inc),复合果胶酶(果胶酶活力单位 7×10^4 U/g, 广东环凯微生物科技有限公司,批号 082047),-葡萄糖苷酶(Sigma, G4511-50 U, 20 ~ 40 U/mg),胰酶(淀粉酶 9 280 U/g,重庆奥力生物制药有限公司),SD 大鼠(250 ~ 280 g, ,成都中医药大学),扫描电镜(AMRAY-1000B USA),测厚仪(0 ~ 0.001 mm,浙江台州淑江精工量具有限公司)。

2 方法与结果

2.1 壳聚糖游离膜的制备:取壳聚糖,加体积分数 2%冰醋酸溶液适量,搅拌使其完全溶解,加入壳聚糖量 20%的邻苯二甲酸二丁酯,以 2%冰醋酸溶液稀释得质量浓度为 2%的壳聚糖溶液,静置脱泡。室温下量取 20 mL 壳聚糖溶液在 20 cm × 20 cm 的洁净玻璃板上铸膜,自然干燥后,经 2%NaOH 溶液处理 2 h 后脱膜,蒸馏水洗至中性,自然干燥制得各种厚度的壳聚糖的均质膜,放入样品袋备用。

2.2 不同降解酶液的制备

2.2.1 复合果胶酶、进口果胶酶以及胰酶溶液的制备:参照《中国药典》2005 年版,配制一定量的 pH 7.6 的人工结肠液,并在结肠液中分别加入不同降解酶,配制成浓度为 350、700、1 400 U/mL 的复合果胶酶溶液, > 200、> 400、> 800 U/mL 的进口果胶酶溶液,以及 464、4 640、9 280 U/mL 的胰酶溶液。

2.2.2 -葡萄糖苷酶溶液的制备:精密称取一定量 -葡萄糖苷酶,用 pH 5.0 磷酸盐缓冲液,配制成 8.8 ~ 17.6 U/mL 的 -葡萄糖苷酶溶液。

2.2.3 大鼠结肠内容物溶液的制备:参照文献报道^[2],制备 SD 大鼠质量分数 30%的盲肠内容物,不断通入 CO₂,调整 pH 值至 7.0,密封于玻璃瓶中,于冰箱中保存备用。

2.3 游离膜降解试验及结果:选取平均膜厚约为 100 μm 的壳聚糖游离膜,切成 3 cm × 1 cm 的小块,精确称定质量,置于含有不同降解酶液的介质中,将溶出杯置于水浴 37℃,搅拌 24 h 后(大鼠结肠内容物不断通入 CO₂)将膜取出用蒸馏水冲洗多次,并用蒸馏水浸泡 24 h,小心拭干,置于干燥器中干燥 7 d,取出重新称定质量,并对易碎游离膜进行电镜观察,计算膜消化度[膜消化度 = (初始膜质量 - 酶解 24 h 后膜质量) / 初始膜质量 × 100%]。消化率与易碎性试验结果见表 1。

可以看出,壳聚糖游离膜在大鼠结肠内容物

表 1 不同降解酶液对壳聚糖游离膜降解效果比较

Table 1 Comparison of degradation of chitosan free-film by different enzymes

降解酶液	酶活力	易碎性	消化率/ %
复合果胶酶	350 U/ mL	不易碎	1.65
	700 U/ mL	不易碎	6.48
	1 400 U/ mL	易碎度高	19.89
进口果胶酶	> 200 U/ mL	不易碎	8.10
	> 400 U/ mL	易碎度高	23.21
	> 800 U/ mL	易碎度高,成碎片	消化较彻底,不能称量
胰酶	464 U/ mL	不易碎	无变化
	4 640 U/ mL	不易碎	1.72
	9 280 U/ mL	不易碎	5.31
-葡萄糖苷酶	8.8 ~ 17.6 U/ mL	不易碎	无变化
大鼠结肠内容物	30 %	易碎度高,成碎片	消化较彻底,不能称量

和 > 800 U/mL 进口果胶酶中降解最为彻底,不能称量;复合果胶酶液在一定浓度下可以对游离膜进行降解,可能是因为含有很多脂肪蛋白酶,但是对膜的敏感程度不如进口果胶酶;本实验条件下 -葡萄糖苷酶对壳聚糖游离膜不敏感;胰酶在低浓度范围内有对游离膜几乎没有降解的现象。

空白游离膜与变异性较大的游离膜的扫描电镜结果见图 1。可以看出,壳聚糖游离膜在大鼠结肠内容物降解后,膜表面最为粗糙,空洞最多而复合果胶酶和进口果胶酶相比较,差别不大。

3 讨论

壳聚糖用乙酸溶解后,使壳聚糖分子中的-NH₂ 转化成-NH₃⁺,该阳离子与玻璃板上的 Si-OH 形成氢键,从而使壳聚糖与玻璃板表面紧密均匀结合,膜干燥后用 NaOH 溶液脱膜,碱水中的 OH⁻ 与-NH₃⁺ 作用使壳聚糖水溶性的-NH₃⁺ 转变成水不溶性的-NH₂,同时使壳聚糖与玻璃板结合力大大降低,因而使壳聚糖可自行脱膜,获得平整均匀的壳聚糖薄膜。

如何判断是否实现了结肠定位是结肠制剂研究

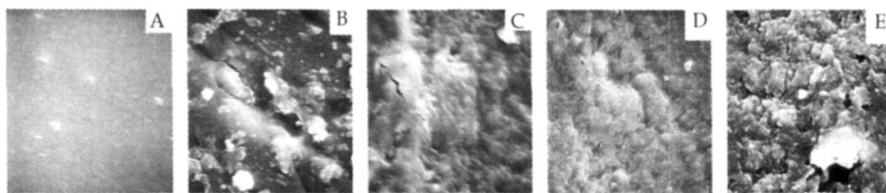


图1 空白游离膜(A)、复合果胶酶(1400 U/mL)降解游离膜(B)、进口果胶酶(>400 U/mL)降解壳聚糖游离膜(C)、进口果胶酶(>800 U/mL)降解壳聚糖游离膜(D)和大鼠结肠内容物(30%)降解壳聚糖游离膜(E)的电镜图

Fig 1 Electronmicroscopicgraph of blank free-film (A), degradation free-film by domestic compound pectinase (1400 U/mL) (B), degradation free-film by imported pectinase (>400 U/mL) (C), degradation free-film by imported pectinase (>800 U/mL) (D), and degradation free-film by rat colon contents (30%) (E)

和评价中最关键的问题。由于不能模拟结肠中大量细菌存在的生理环境,而不能准确地预测体内行为。故应用改良方法以弥补传统方法的不足。有报道^[3]将动物盲肠内容物加入溶出介质中评价BCDDS。啮齿类动物结肠菌群特征与人类相似,因此常用大鼠盲肠内容物,由于盲肠处细菌的厌氧性,大鼠盲肠内容物的收集、稀释以及溶出实验需在无氧环境下进行,如通入二氧化碳或氮气,但批次间重现性差,因此在选择大鼠时需注意种属和性别。另外为简化操作,提高重现性,可从大鼠盲、结肠内容物中提取得到含内容物降解酶(胞内、胞外酶)的介质,如提取含胞内外酶的上清液混合后作为含内容物降解酶的介质使用。

壳聚糖在体内的生物降解主要是酶解过程,酶法降解可特异性地、选择性地切断壳聚糖的-(1,4)糖苷键,这一观点已被许多学者所证实。有文献报道^[4],还有许多酶制剂,如葡萄糖酶、蛋白酶、脂酶、纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶等30多种酶能有效水解壳聚糖。因此,在壳聚糖结构及在相关文献报道基础上,本实验选择-葡萄糖苷酶、果胶酶、胰酶作为降解介质与大鼠结肠内容物比较。

大量的报道-葡萄糖苷酶对壳聚糖有特异性降解能力,也有报道^[5]-葡萄糖苷酶对壳聚糖凝胶降解作用不明显,虽然它模拟人体结肠菌种,但是作用微弱。本实验配制活力为8.8~17.6 U/mL的酶液,结果显示对壳聚糖游离膜不敏感,可能是由于酶液活力远远小于体内酶活力。再者,由于人体对水

等成分的重吸收,使结肠内容物呈半固体状,因而简单的加酶法不能模拟结肠的流体学特性,并且-葡萄糖苷酶价格昂贵。因此用-葡萄糖苷酶代替大鼠结肠内容物进行制剂体外评价的方法有一定的局限。

菌群触发型口服结肠定位递送系统虽是研究热点之一,但上市产品有限,同时,目前国内外也没有统一的体外评价的实验方法。本实验对游离膜降解性能考察的方法简单,条件一致性好,能有效减少试验结果的偶然误差,通过该手段可初步筛选更好的体外评价方法,对结肠靶向制剂的发展有着重要的作用,但由于制备方法的差异,游离膜与实际包衣膜可能存在一定的差异,为了更好得到制剂中的包衣以及体外释放度参数,还需进行后期的相关性比较和进一步研究。

参考文献:

- [1] 莫 韪,张钧寿. 结肠靶向给药系统研究进展[J]. 中国新药杂志,1999,8(6):368-371.
- [2] Tozaki H, Emi Y, Horisaka E, et al. Degradation of insulin and calcitonin and their protection by various protease inhibitors in rat caecal contents: implications in peptide delivery to the colon [J]. *Pharm Pharmacol*, 1997, 49: 164.
- [3] Semde R, Amitanabe S. Effect of pectinolytic enzymes on the theophylline release from pellets coated with water insoluble polymers containing pectin HM or calcium pectinate [J]. *Int J Pharm*, 2000, 197(1-2): 169.
- [4] 曾宪放,陈苏陵,李吉高. 甲壳质和甲壳胺寡聚糖的制备[J]. 中国海洋药物,1995(3):46-51.
- [5] Zhang H, Alsarra I A, Neau S H. An *in vitro* evaluation of a chitosan-containing multiparticulate system for macromolecule delivery to the colon [J]. *Int J Pharm*, 2002, 239: 197-205.